



(19) BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

(12) Offenlegungsschrift  
(10) DE 100 14 085 A 1

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 N 9/02**

C 12 N 15/53  
C 07 H 21/04  
C 12 N 15/63  
C 12 N 15/70  
C 12 N 1/21  
C 12 P 1/04  
C 12 P 17/18  
// (C12N 9/02,C12R  
1:11)(C12N 1/21,C12R  
1:19)(C12P 17/18,  
C12R 1:19)

(71) Anmelder:  
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

(74) Vertreter:  
Reitstötter, Kinzebach & Partner, 81679 München

(72) Erfinder:  
Hauer, Bernhard, Dr., 67136 Fußgönheim, DE; Li,  
Qing-shan, Dr., Kyoto, JP; Schwaneberg, Ulrich, Dr.,  
71336 Waiblingen, DE; Schmid, Rolf, Prof. Dr.,  
70329 Stuttgart, DE; Lutz-Wahl, Sabine, Dr., 70569  
Stuttgart, DE; Appel, Daniel, Dr., 74348 Lauffen, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

- (54) Neue Cytochrom P450-Monoxygenasen und deren Verwendung zur Oxidation von organischen Verbindungen
- (57) Die Erfindung betrifft neue Cytochrom P450-Monoxygenasen mit verändertem Substratprofil, dafür kodierende Nukleotidsequenzen, diese Sequenzen enthaltende Expressionskonstrukte und Vektoren, damit transformierte Mikroorganismen, Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation verschiedener organischer Substrate wie beispielsweise Verfahren zur Herstellung von Indigo und Indirubin.

DE 100 14 085 A 1

DE 100 14 085 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Cytochrom P450-Monoxygenasen, welche zur Oxidation verschiedener organischer Substrate, wie z. B. N-heterocyclischer aromatischer Verbindungen, befähigt sind, dafür kodierende Nukleotidsequenzen, diese Sequenzen enthaltende Expressionskonstrukte und Vektoren, damit transformierte Mikroorganismen, Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation N-heterocyclischer aromatischer Verbindungen und insbesondere Verfahren zur Herstellung von Indigo und Indirubin.

Enzyme mit neuartigen Funktionen und Eigenschaften können entweder durch Screening natürlicher Proben oder durch Protein Engineering bekannter Enzyme bereitgestellt werden. Die letztgenannte Methode kann unter Umständen die geeigneter sein, um Eigenschaften zu induzieren, deren Generierung auf dem Wege natürlicher Selektion unwahrscheinlich ist. Trotz zahlreicher Anstrengungen zum Engineering von Enzymen gibt es bisher nur wenige erfolgreiche Studien zur Förderung der katalytischen Aktivität von Enzymmutanten bezüglich eines bestimmten Substrates (1–10). In diesen bekannten Fällen sind die Substrate strukturell eng verwandt mit dem nativen Substrat des jeweiligen Enzyms. Bisher gibt es keine Berichte über ein erfolgreiches Engineering von Enzymen, welche nach der Modifikation die Umsetzung einer Verbindung katalysieren, welche strukturell völlig verschieden vom nativen Substrat des Enzyms ist.

Die aus dem Bakterium *Bacillus megaterium* isolierbare Cytochrom P450-Monoxygenase katalysiert gewöhnlich die subterminale Hydroxylierung langkettiger, gesättigter Säuren und der entsprechenden Amide und Alkohole davon oder die Epoxidation ungesättigter langkettiger Fettsäuren oder gesättigter Fettsäuren mit mittlerer Kettenlänge (11–13). Die optimale Kettenlänge gesättigter Fettsäuren beträgt 14 bis 16 Kohlenstoffatome. Fettsäuren mit einer Kettenlänge von weniger als 12 werden nicht hydroxyliert (11).

Die Struktur der Häm-Domäne von P450 BM-3 wurde durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt (14–16). Die Substratbindungsstelle liegt in Form einer langen tunnelartigen Öffnung vor, welche von der Moleküloberfläche bis hin zum Häm-Molekül reicht und wird fast ausschließlich von hydrophoben Aminosäureresten begrenzt. Die einzigen geladenen Reste an der Oberfläche der Häm-Domäne sind die Reste Arg47 und Tyr51. Man nimmt an, daß diese an der Bindung der Carboxylatgruppe des Substrates durch Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sind (14). Die Mutation von Arg47 zu Glu bewirkt eine Inaktivierung des Enzyms für Arachidonsäure (13), erhöht jedoch dessen Aktivität gegenüber C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>-Alkyltrimethylammonium-Verbindungen (17). Eine Substratnutzung für aromatische Verbindungen, insbesondere ein-, zwei- oder mehrkernige, gegebenenfalls heterocyclische, Aromaten, Alkane, Alkene, Cycloalkane und -alke, wurde für dieses Enzym nicht beschrieben. Es wurde deshalb bisher in der Fachwelt angenommen, daß andere als die bisher beschriebenen organischen Substrate, wie z. B. Indol, aufgrund der deutlichen strukturellen Unterschiede zu den nativen Substraten von P450 BM-3, insbesondere aufgrund des Fehlens funktioneller Gruppen, welche an die oben erwähnten Reste in der Substrattasche binden könnten, keine Substrat darstellen.

Es ist deshalb Aufgabe der vorliegenden Erfindung neue Cytochrom P450 Monoxygenasen mit veränderter Substratspezifität oder verändertem Substratprofil bereit zu stellen. Insbesondere sollten Monoxygenase-Mutanten bereitgestellt werden, welche im Vergleich zu dem nichtmutierten Enzym mit strukturell deutlich anderen Substraten enzymatisch aktiv sind.

Diese Aufgabe konnte überraschenderweise gelöst werden durch neuartige Cytochrom P450 Monoxygenasen, welche z. B. zur Oxidation N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen befähigt sind.

Insbesondere sind Gegenstand der Erfindung solche Monoxygenasen, deren Substrat-bindender Bereich durch ortspezifische Mutagenese zur funktionalen Aufnahme neuer, wie z. B. N-heterocyclischer Substrate, befähigt ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die neuen Monoxygenase löslich, d. h. in nicht-membran gebundener Form existent, und in dieser Form enzymatisch aktiv.

Die erfindungsgemäßen Monoxygenasen sind vorzugsweise abgeleitet von Cytochrom P450 Monoxygenasen bakteriellen Ursprungs, wie insbesondere abgeleitet von Cytochrom P450 Monoxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, welche wenigstens eine funktionelle, d. h. die Oxidation neuer organischer Substrate, wie z. B. N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen, fördernde Mutation, in einem der Aminosäuresequenzbereiche 172–224 (F/G-loop-Bereich), 39–43 ( $\beta$ -strand 1), 48–52 ( $\beta$ -strand 2), 67–70 ( $\beta$ -strand 3), 330–335 ( $\beta$ -strand 5), 352–356 ( $\beta$ -strand 8), 73–82 (helix 5) und 86–88 (helix 6) aufweist.

Die erfindungsgemäß bereitgestellten Cytochrom P450 Monoxygenase-Mutanten, sind bevorzugt zu wenigstens einer der folgenden Reaktionen befähigt:

- a) Oxidation gegebenenfalls substituierter N-, O- oder S-heterocyclischer ein-, zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen;
- b) Oxidation gegebenenfalls substituierter ein- oder mehrkerniger Aromaten;
- c) Oxidation geradkettiger oder verzweigter Alkane und Alkene; und
- d) Oxidation gegebenenfalls substituierter Cycloalkane und Cycloalkene

Besonders bevorzugten Monoxygenase-Mutanten dieses Typs sind, dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens eine der folgenden ein- oder mehrfachen Aminosäuresubstitutionen aufweist:

- 60 1) Phe87Val;
- 2) Phe87Val, Leu188Gln; oder
- 3) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly;

65 sowie funktionale Äquivalente davon. Der Zahlenwert gibt dabei die Position der Mutation an; vor dem Zahlenwert steht die ursprüngliche, hinter dem Zahlenwert die neu eingeführte Aminosäure.

Funktionale Äquivalente oder Analoga der konkret offenbarten Mutanten sind in diesem Zusammenhang davon verschiedene Mutanten, welche weiterhin die gewünschte Substratspezifität im Rahmen wenigstens einer der oben bezeichneten

# DE 100 14 085 A 1

neten Oxidationsreaktionen a) bis d), also beispielsweise gegenüber heterozyklischen Aromaten, besitzen und z. B. Indol hydroxylieren.

Unter "funktionalen Äquivalenten" versteht man erfundungsgemäß auch Mutanten, welche in wenigstens einer der oben genannten Sequenzpositionen eine andere als die konkret genannte Aminosäuresubstitution aufweisen, aber trotzdem zu einer Mutante führen, die ebenso wie die konkret genannte Mutante ein gegenüber dem Wildtypenzym "verändertes Substratprofil" zeigen und wenigstens eine der oben genannten Oxidationsreaktionen katalysieren. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Veränderungen im Reaktivitätsmuster qualitativ übereinstimmen, d. h. beispielsweise gleiche Substrate mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden.

"Funktionale Äquivalente" umfassen natürlich auch P450-Monooxygenase-Mutanten, welche in gleicher Weise wie die konkret genannten P450 BM3-Mutanten durch Mutation von P450-Enzymen aus anderen Organismen zugänglich sind. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen. Mit den modernen Methoden des Molecular Modeling können dann in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente, das Reaktionsmuster beeinflussende Mutationen vorgenommen werden.

"Funktionale Äquivalente" umfassen ebenso die durch eine oder mehrere zusätzliche Aminosäure-Additionen, -Substituenten, -Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen Mutanten, wobei die genannten zusätzlichen Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit "verändertem Substratprofil" im obigen Sinne führen.

Erfundungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe a) sind gegebenenfalls substituierte heterocyclische ein-, zwei- oder mehrkernige aromatischen Verbindungen; insbesondere oxidierbare oder hydroxylierbare N-, O- oder S-heterocyclische ein-, zwei- oder mehrkernige aromatische Verbindungen. Sie umfassen vorzugsweise zwei oder drei, insbesondere zwei, vier- bis siebengliedrige, insbesondere sechs- oder fünfgliedrige, kondensierte Ringe, wobei wenigstens einer der aromatischen Ringe ein bis drei, vorzugsweise alle Ringe aromatischen Charakter besitzen und wobei wenigstens einer der aromatischen Ringe ein bis drei, vorzugsweise ein N-, O- oder S-Heteroatom im Ring trägt. In der gesamten Ringstruktur können gegebenenfalls ein oder zwei weitere gleiche oder verschiedene Heteroatome enthalten sein. Die aromatischen Verbindungen können weiterhin 1 bis 5 Substituenten an den Ring-Kohlenstoff- oder an den Heteroatomen tragen. Beispiele für geeignete Substituenten sind C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>-Alkyl, wie Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl oder n-, i- oder t-Butyl oder C<sub>2</sub> bis C<sub>4</sub>-Alkenyl, wie Ethenyl, 1-Propenyl, 2-Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl oder 3-Butenyl, Hydroxyl und Halogen, wie F, Cl, und Br. Die genannten Alkyl- oder Alkenylsubstituenten können gegebenenfalls auch eine Keto- oder Aldehydgruppe aufweisen; Beispiele hierfür sind Propan-2-on-3-yl, Butan-2-on-4-yl, 3-Buten-2-on-4-yl. Nichtlimitierende Beispiele für geeignete heterocyclische Substrate sind insbesondere zweikernige Heterocyclen, wie Indol, N-Methylindol und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon, wie z. B. 5-Chlor- oder 5-Brom-indol; sowie Chinolin und Chinolinderivate, wie z. B. 8-Methylchinolin, 6-Methylchinolin und Chinaldin; und Benzothiophen und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon. Außerdem seien genannt dreikernige Heteroaromatene wie Acridin und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.

Erfundungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe b) sind gegebenenfalls substituierte ein- oder mehrkernige, insbesondere ein- oder zweikernige Aromaten, wie Benzol und Naphthalin. Die aromatischen Verbindungen können gegebenenfalls ein oder mehrfach substituiert sein und z. B. 1 bis 5 Substituenten an den Ring-Kohlenstoffatomen tragen. Beispiele für geeignete Substituenten sind C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>-Alkyl, wie Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl oder n-, i- oder t-Butyl, oder C<sub>2</sub> bis C<sub>4</sub>-Alkenyl, wie Ethenyl, 1-Propenyl, 2-Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl oder 3-Butenyl, Hydroxyl und Halogen, wie F, Cl, und Br. Die genannten Alkyl- oder Alkenylsubstituenten können gegebenenfalls auch eine Keto- oder Aldehydgruppe aufweisen; Beispiele hierfür sind Propan-2-on-3-yl, Butan-2-on-4-yl, 3-Buten-2-on-4-yl. Der Aromat kann gegebenenfalls mit einem vier- bis siebengliedrigen, nichtaromatischen Ring kondensiert sein. Der nichtaromatische Ring kann gegebenenfalls eine oder zwei C-C-Doppelbindungen aufweisen, ein- oder mehrfach mit oben genannten Substituenten substituiert sein und gegebenenfalls ein oder zwei Ringheteroatome tragen. Beispiele für besonders brauchbare Aromaten sind einkernige Aromaten, wie Cumol, sowie zweikernige Substrate, wie Inden und Naphthalin, sowie die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.

Erfundungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe c) sind geradkettige oder verzweigte Alkane oder Alkene mit 4 bis 15, vorzugsweise 6 bis 12 Kohlenstoffatomen. Als Beispiele können genannt werden n-Pantan, n-Hexan, n-Heptan-, n-Oktan, n-Nonan, n-Decan, n-Undecan und n-Dodecan, sowie die ein- oder mehrfach verzweigten Analoga dieser Verbindungen, wie z. B. analoge Verbindungen mit 1 bis 3 Methyl-Seitengruppen; oder die ein- oder mehrfach, beispielsweise einfach ungesättigten Analoga der oben genannten Alkane.

Erfundungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe d) sind gegebenenfalls substituierte Cycloalkane und Cycloalkene. Beispiele hierfür sind Cyclopantan, Cyclopenten, Cyclohexan, Cyclohexen, Cycloheptan und Cyclohepten. Die Ringstruktur kann dabei ein- oder mehrfach, wie z. B. 1 bis 5 Substituenten gemäß obiger Definition für Verbindungen der Gruppen a) und b) tragen. Nichtlimitierendes Beispiel hierfür sind Ionone, wie α-, β- und γ-Ionon, sowie die entsprechenden Methylionone und Isomethylionone. Besonders bevorzugt sind α- und β-Ionon.

Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen, kodierend für eine der obigen Monooxygenasen. Bevorzugte Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von SEQ ID NO: 1, welche wenigstens eine Nukleotidsubstitution aufweist, die zu einer der oben beschriebenen funktionellen Aminosäuremutationen führt. Gegenstand der Erfindung sich außerdem durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide erhaltenen funktionalen Analoga der Nukleinsäuren, welche weiterhin für eine Monooxygenase mit der gewünschten Substratspezifität, insbesondere mit Indol-oxidierender Aktivität, kodieren.

Erfundungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eins speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten davon.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulierter Nukleinsäuresequenzen eine für eine erfundungsgemäße Mutante kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

# DE 100 14 085 A 1

Vorzugsweise umfassen die erfundungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.

Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keiner Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Beispiele für brauchbare Promotoren sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, I-PR- oder im I-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2, die Hefepromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH oder die Pflanzenpromotoren CaMV35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z. B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der  $P_{\text{r}}P_{\text{i}}$ -Promotor.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promoters mit einer geeigneten Monooxygenase-Nukleotidsequenz sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E. F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T. J. Silhavy, M. L. Berman und L. W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einem wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

Mit Hilfe der erfundungsgemäßen Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfundungsgemäßen Vektor transformiert sind und zur Produktion der Mutanten eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfundungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebbracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.

Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfundungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen Escherichia, wie z. B. Escherichia coli, Streptomyces, Bacillus oder Pseudomonas, eukaryotische Mikroorganismen, wie Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise SF9 oder CHO-Zellen.

Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Bei den transgenen Organismen kann es sich auch um sogenannte Knock-Out Tiere oder Pflanzen handeln, in denen das korrespondierende endogene Gen ausgeschaltet wurde, wie z. B. durch Mutation oder partielle oder vollständige Deletion.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen gemäß obiger Definition, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

a1) einen rekombinanten Mikroorganismus gemäß obiger Definition in einem Kulturmedium in Gegenwart eines exogenen (von außen zugesetzten) oder intermediär gebildeten Substrats, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff, kultiviert; oder

# DE 100 14 085 A 1

- a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium mit einem erfundungsgemäßen Enzym, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff und einem Elektronendonator, inkubiert; und  
b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.

Bevorzugt ist das exogene oder intermediär gebildete Substrat ausgewählt unter

- a) gegebenenfalls substituierten N-heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen armotischen Verbindungen;  
b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;  
c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;  
d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen.

Eine bevorzugte Verfahrensvariante ist auf die Bildung von Indol/Indirubin gerichtet und dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat intermediär gebildetes Indol ist und man aus dem Medium das anfallende Indigo und/oder Indirubin isoliert, welches durch Oxidation von intermediately gebildetem Indol erzeugt wurde.

Wird die Umsetzung mit einem rekombinanten Mikroorganismus durchgeführt, so erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z. B. TB- oder LB-Medium bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20 bis 40°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Die Zugabe von Indol ist gewöhnlich nicht erforderlich, da dieses vom Mikroorganismus intermediately gebildet wird. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren, insbesondere temperaturinduzierbaren, Promoters. Man erhöht dabei die Temperatur auf die erforderliche Induktionstemperatur, z. B. 42°C beim P<sub>r</sub>P<sub>r</sub>-Promotor, behält dies über einen ausreichenden Zeitraum, z. B. 1 bis 10 oder 5 bis 6 Stunden, zur Expression der Monoxygenase-Aktivität bei und verringert anschließend der Temperatur wieder einen Wert von etwa 30 bis 40°C. Die Kultivierung wird dann in Gegenwart von Sauerstoff 12 Stunden bis 3 Tage fortgesetzt. Der pH-Wert kann dabei durch Zugabe von Na-OH, z. B. auf 9 bis 10, erhöht werden, wodurch die Indigobildung bzw. Indirubinbildung durch Luftoxidation der enzymatisch gebildeten Oxidationsprodukte 2- und 3-Hydroxyindol zusätzlich gefördert wird.

Wird die erfundungsgemäße Umsetzung (Mono- und/oder Di-Hydroxylierung) dagegen mit gereinigtem oder angereichertem Enzym durchgeführt so löst man das erfundungsgemäße Enzym in einem exogenen Substrat enthaltenden, wie z. B. Indol enthaltenden, Medium (etwa 0,01 bis 10 mM, oder 0,05 bis 5 mM), und führt die Umsetzung, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff, bei einer Temperatur von etwa 10 bis 50°C, wie z. B. 30 bis 40°C, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 (wie z. B. eingestellt mit 100 bis 200 mM Phosphat- oder Tris-Puffer), sowie in Gegenwart eines Reduktionsmittels durch, wobei das Substrat-haltige Medium außerdem bezogen auf das zu oxidierende Substrat einen etwa 10- bis 100-fachen molaren Überschuss an Reduktionsäquivalenten enthält. Bevorzugtes Reduktionsmittel ist NADPH.

Beim erfundungsgemäßen Substratoxidationsprozess wird im Reaktionsmedium enthalterner oder zugesetzter Sauerstoff reduktiv enzymatisch gespalten. Die erforderlichen Reduktionsäquivalente werden von dem zugesetzten Reduktionsmittel (Elektronendonator) zur Verfügung gestellt.

Das gebildete Oxidationsprodukt kann dann in herkömmlicher Weise, wie z. B. durch Extraktion oder Chromatographie, vom Medium abgetrennt und gereinigt werden.

Weitere Gegenstände der Erfindung betreffen Bioreaktoren, umfassend ein erfundungsgemäßes Enzym oder einen erfundungsgemäßen rekombinanten Mikroorganismus in immobilisierter Form.

Ein letzter Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfundungsgemäßen Cytochrom P450 Monoxygenase oder eines erfundungsgemäßen Vektors oder Mikroorganismus zur mikrobiologischen Oxidation eines Substrates aus einer der Gruppen a) bis d), insbesondere N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger armotischer Verbindungen, und bevorzugt zur Bildung von Indigo und/oder Indirubin.

Die vorliegende Erfindung wird nunmehr unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele näher beschrieben.

## Beispiel 1

### Randomisierung spezieller Codons von P450 BM-3

Die Versuche wurden im wesentlichen wie beschrieben in (19) durchgeführt. Drei Positionen (Phe87, Leu188 und Ala74) wurden mit Hilfe von ortsspezifischer Mutagenese unter Verwendung des Stratagene QuikChange kit (La Jolla, CA, USA) randomisiert. Folgende PCR-Primer wurden für die einzelnen Positionen verwendet: Phe87: 5'-gcaggagacgggttgnnnacaagctggacg-3' (SEQ ID NO: 3), 5'-cgccagcttgttnncaaccggcttcgtc-3', (SEQ ID NO: 4) Leu188: 5'-gaaggaaatggaaacggcggcaatccag-3' (SEQ ID NO: 5), 5'-ctggattttcgctcgctgnnnctttcatgcitc-3' (SEQ ID NO: 6; Ala74: 5'-gcttgataaaaacttaaggtaanncttaatttgtacg-3' (SEQ ID: No: 7, 5'-cgatcacaatttaaagnnnttgacttaaggttttatcaaaggc-3' (SEQ ID NO: 8)

Die Bedingungen für die PCR waren für alle drei Positionen identisch. Insbesondere wurden je 50 µl Reaktionsvolumen 17,5 pmol eines jeden Primers, 20 pmol Template-Plasmid-DNA, 3 U der Pfu Polymerase und 3,25 nmol von jedem dNTP verwendet. Die PCR Reaktion wurde bei 94°C/1 min gestartet und dann wurde folgender Temperaturzyklus 20 mal durchgeführt: 94°C, 1 min; 46°C, 2,5 min; 72°C, 17 min. Nach 20 Zyklen wurde die Reaktion 15 min bei 72°C fortgesetzt. Nach der PCR wurde die Template DNA mit 20 U DpnI bei 37°C 3 h verdaut. Anschließend wurde E. coli DH5α transformiert. Die transformierten E. coli DH5α-Zellen wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert, welche 150 µg/ml Ampicillin enthielten. Anschließend wurde 18 h bei 37°C inkubiert.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# DE 100 14 085 A 1

## Beispiel 2

### Expression und Reinigung der P450 BM-3 und dessen Mutanten und Produktion eines blauen Pigmentes

- 5 Das P450 BM-3-Gen und die Mutanten davon wurden unter der Kontrolle des starken, Temperatur-induzierbaren  $P_{RPL}$ -Promoters des Plasmids pCYTEXP1 in *E. coli* DH5 $\alpha$  wie bereits beschrieben (20), exprimiert. Kolonien wurden mit sterilen Zahnstochern aufgenommen und in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen, enthaltend je Vertiefung 200  $\mu$ l TB-Medium und 100  $\mu$ g/ml Ampicillin transferiert. Anschließend wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. 40  $\mu$ l der Zellkultur einer jeden Vertiefung wurden anschließend in ein Kulturröhrchen überführt, das 2 ml TB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin enthält. Anschließend wurde 2 h bei 37°C kultiviert. Dann wurde die Temperatur zur Induktion 6 h auf 42°C erhöht. Dann wurde die Kultivierung über Nacht bei 37°C fortgesetzt, wobei ein blaues Pigment produziert wurde.
- 10 Die präparative Herstellung von Enzym oder blauem Pigment wurde ausgehend von einer 300 ml Zellkultur ( $OD_{578\text{ nm}} = 0,8$  bis 1,0) durchgeführt. Zur Isolierung des Enzyms wurden die Zellen 10 min bei 4000 Upm abzentrifugiert, in 0,1 M  $K_3PO_4$ -Puffer, pH 7,4 resuspendiert. Die eisgekühlten Zellen wurden mit Hilfe eines Branson Sonifiers W25 (Dietzenbach, Deutschland) bei einer Energieoutput von 80 W durch dreimalige Beschallung von 2 min vorsichtig aufgeschlossen. Die Suspensionen wurden 20 min bei 32570  $\times$  g zentrifugiert. Der Rohextrakt wurde zur Aktivitätsbestimmung bzw. zur Enzymreinigung eingesetzt. Die Enzymreinigung erfolgte wie in (21) bereits beschrieben, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird. Die Konzentration an gereinigtem Enzym wurde über die Extinktionsdifferenz bei 450 und 490 nm, wie in (11) bereits beschrieben, unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von 91  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bestimmt.
- 15

## Beispiel 3

### Isolierung von Mutanten, welche große Mengen an blauem Pigment produzieren

- 25 Jeweils 100 Kolonien wurden von den Mutanten einer jeden Position isoliert, welche durch randomisierte Mutagenese des Codons der entsprechenden Position erzeugt wurden. Diese Kolonien wurden in Kulturröhrchen zur Produktion von blauem Pigment kultiviert. Nach dem Waschen der Zellen mit Wasser und mehreren langsamen Zentrifugationsschritten (500 Upm) wurde das blaue Pigment mit Dimethylsulfoxid (DMSO) extrahiert. Die Löslichkeit des blauen Pigmentes 30 war in DMSO am größten. Die Absorption des Extraktes wurde bei 677 nm bestimmt. Diejenige Mutante, welche die größte Menge an blauem Pigment von allen Mutanten einer bestimmten Position produzierte, wurde für eine DNA-Sequenzierung (ABI DNA Sequenzierungs-Kit; ABI Prism™ 377 DNA Sequencer) verwendet und außerdem als Template für ortsspezifische randomisierte Mutagenese verwendet.

## Beispiel 4

### Aktivitätstest für die Indol-Hydroxylierung

- 35 Die Indol-Hydroxylierungsaktivität wurde in einer Lösung getestet, die 8  $\mu$ l einer 10–500 mM Indollösung in DMSO, 850  $\mu$ l Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,2) und 0,6 nmol P450 BM-3 Wildtyp oder Mutante in einem Endvolumen von 1 ml enthielt. Das Gemisch wurde 9 min vorinkubiert, bevor man die Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu$ l einer wässrigen 1 mM Lösung von NADPH startete. Die Reaktion wurde nach 20 sec durch Zugabe von 60  $\mu$ l 1,2 M KOH gestoppt. Innerhalb von 5 bis 30 sec (unter aeroben Bedingungen) wurden die Enzymprodukte vollständig in Indigo [ $\Delta^{2,2'}\text{-Biindolin}-3,3'$ -dion] und Indirubin ( $\Delta^{2,3'}\text{-Biindolin}-2,3'$ -dion) überführt. Die Indigoproduktion wurde über dessen Absorption bei 670 nm bestimmt. Eine Eichkurve mit reinem Indigo zeigte einen Extinktionskoeffizienten von 3,9  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei dieser Wellenlänge. Ein linearer Kurvenverlauf wurde für die Indigoproduktion in einer Reaktionszeit von 40 sec unter Verwendung von 0,6 nmol Wildtyp bzw. P450 BM-3-Mutante und 0,05 bis 5,0 mM Indol erhalten. Indirubin zeigt eine sehr schwache Absorption bei 670 nm und die gebildete Indirubinmenge war sehr viel geringer als die gebildete Indigo-menge. Die Bildung von Indirubin wurde bei der Bestimmung der kinetischen Parameter vernachlässigt. Der NADPH-Verbrauch wurde bei 340 nm bestimmt und unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten, von 6,2  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  wie beschrieben (17) berechnet.

## Beispiel 5

### Reinigung von Indigo und Indirubin

- 55 Nach Waschen der Zellen mit Wasser und wiederholter Zentrifugation bei 500 g wurde das gebildete blaue Pellet mit Tetrahydrofuran (THF) extrahiert. Der Extrakt wurde bis fast zur Trockene eingedampft und das rote Pigment wurde mehrmals mit 50 ml absolutem Ethanol extrahiert. Der verbleibende blaue Feststoff wurde in THF gelöst und durch Dünnschichtchromatographie (TLC) analysiert. Die Ethanollösung wurde eingedampft und durch Silicagelchromatographie (DC 60, Merck, Darmstadt, Deutschland; 2 cm  $\times$  30 cm) gereinigt, bevor sie mit THF und Petrolether in einem Verhältnis von 1 : 2 gewaschen wurde. Die erhaltene rote Lösung wurde eingedampft und deren Reinheit wurde durch TLC bestimmt. Die Absorptionspektren des blauen und des roten Pigmentes wurden mit Hilfe eines Ultraspec 3000 Spektrophotometers (Pharmacia, Uppsala, Sweden) in einem Bereich von 400 bis 800 nm bestimmt. Außerdem wurde der blaue und der rote Farbstoff durch Massenspektrometrie und  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie analysiert.

# DE 100 14 085 A 1

## Versuchsergebnisse

### 1. Erhöhung der Produktivität für blaues Pigment durch P450 BM-3-Mutagenese

Natives P450 BM-3 besitzt nicht die Fähigkeit zur Produktion des blauen Indigo-enthaltenden Pigments, bzw. der Vorläufersubstanzen 2- bzw 3-Hydroxyindol. Um eine ausreichende Menge an blauem Pigment herstellen zu können, wurde P450 BM3 einer gezielten Evolution ausgesetzt. Sämtliche Mutanten, welche das blaue Pigment produzierten, wurden sequenziert. Es wurde festgestellt, daß wenigstens eine der folgenden drei Positionen mutiert waren: Phe87, Leu188 und Ala74. Es wurde deshalb angenommen, daß diese drei Positionen eine entscheidende Rolle für die Aktivität von P450 BM-3 bei der Produktion von blauem Pigment spielen. Aus der Struktur der Häm-Domäne von Cytochrom-P450-BM 3, komplexiert mit Palmitoleinsäure sieht man, daß Phe87 das Substrat an einem näheren Heranrücken an die Häm-Gruppe hindert (14). Die Mutante Phe87Val zeigt eine hohe Regio- und Stereoselektität bei der Epoxidation von (14S, 15R)-Arachidonsäure (13) und die Mutante Phe87Ala verschiebt die Hydroxylierungsposition von  $\omega$ -1,  $\omega$ -2 und  $\omega$ -3 zu  $\omega$  (22). Die Position 87 wurde deshalb als erste für die ortspezifische randomisierte Mutagenese mit Hilfe von PCR ausgewählt. In Röhrchenkulturen wurden 7 Kolonien erhalten, welche eine geringe Menge an blauem Pigment nach Induktion produzierten. Die Kolonie, welche die größte Menge des blauen Pigments produzierte, wurde für die DNA-Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenzdaten ergaben eine Substitution von Phe87 durch Val. Die Mutante Phe87Val wurde anschließend als Template für die zweite Runde der ortsspezifischen randomisierten Mutagenese an Position Leu188 verwendet. Die Struktur der Häm-Domäne, komplexiert mit Palmitoleinsäure zeigt, daß die Repositionierung der F- und G-Helices den Rest Leu188 in direkten Kontakt mit dem Substrat bringt (14). Diese Position könnte deshalb eine wichtige Rolle bei der Substratbindung oder -orientierung spielen. Nach dem zweiten Screeningdurchgang wurden 31 Kolonien beobachtet, welche das blaue Pigment produzierten. Die Mutante, welche die größte Pigmentmenge produzierte, enthielt die Substitutionen Phe87Val und Leu188Gln. Diese Mutante wurde anschließend in Position Ala74 im dritten Durchgang der ortsspezifischen randomisierten Mutagenese mutiert. Man erhielt dabei die Dreifachmutante F87L188A74 (Phe87Val, Leu188Gln und Ala74Gly), welche mehrere mg blaues Pigment in einem 2-Liter-Kolben, enthaltend 300 ml TB-Medium, produzierte. Diese Menge reichte zur Isolierung und Charakterisierung des blauen Pigmentes aus.

### 2. Isolierung und Identifizierung des blauen Pigments

Nach dem Auswaschen der Zellen wurde das verbleibende blaue Pellet mit THF extrahiert und TLC analysiert. Das blaue Pigment wurde in eine schneller wandernde blaue Komponente und in eine langsamer wandernde rote Komponente aufgetrennt. Beide Komponenten zeigten exakt die gleichen Mobilitätsparameter wie die Komponenten einer kommerziellen Indigo-Probe.

Nach der Reinigung wurden die Absorptionsspektren beider Komponenten in DMSO bestimmt. Die blaue Komponente zeigte das gleiche Spektrum wie eine kommerzielle Indigoprobe. Die gereinigte blaue und rote Komponente wurden jeweils durch Massenspektrometrie analysiert. Die Massenspektren beider Pigmente zeigten einen starken Molekülionenpeak bei m/z = 262 und zwei Fragmentionenpeaks bei m/z = 234 und 205 (relative Intensität jeweils 10%). Dieses Muster ist typisch für indigoide Verbindungen. Die Elementarzusammensetzung dieser Ionen wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie bestimmt als C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O bzw. C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>. Dies ist ebenfalls charakteristisch für Strukturen vom Indigotyp. Das blaue Pigment wurde somit als Indigo und das rote Pigment als Indirubin bestimmt. Zur Bestätigung der Struktur wurden 500 MHz <sup>1</sup>H-NMR-Spektren beider Pigmente in DMSO-D<sub>6</sub>-Lösung durchgeführt. Die Ergebnisse stimmten mit den Literaturangaben (23) überein.

### 3. Produktion von Indigo mit isolierten Enzymen

Es ist bekannt, daß Indigo aus Indol durch mikrobielle Transformation zugänglich ist (24–26). Keines dieser mikrobiellen Systeme enthielt jedoch eine P450 Monooxygenase. Erfindungsgemäß wurde zunächst die katalytische Aktivität des reinen Enzyms für Indol bestimmt. Die Mutante F87L188A74 wurde mit Indol vermischt. Keine Farbreaktion war zu beobachten. Erst nach Zugabe von NADPH zum Reaktionsgemisch bildete sich das blaue Pigment nach etwa 20 min. Durch Einstellung des pH-Werts der Reaktionsmischung auf einen Wert von etwa 11, 30 sec nach Zugabe von NADPH, wurde die blaue Färbung innerhalb von wenigen Sekunden sichtbar. Kontrollversuche unter Verwendung von natürlichem P450 BM-3 waren immer negativ, selbst unter Verwendung erhöhter Konzentrationen an Enzym, Indol und NADPH. Das blaue Pigment wurde mit Ethylacetat extrahiert und durch TLC analysiert. Das blaue Pigment trennte sich wieder in eine schneller laufende blaue Komponente und in eine Langsamer laufende rote Komponente auf. Die R<sub>f</sub>-Werte und die Absorptionsspektren waren identisch mit denjenigen Werten der Extakte aus der Fermentationsbrühe. Die F87L188A74-Mutante von P450 BM-3 stellt somit eine Indolhydroxylase dar.

Es sind bisher zwei Wege für die enzymatische Transformation von Indol zu Indigo beschrieben worden. Ein Weg wird durch eine Dioxygenase, der andere durch eine Styrolmonooxygenase katalysiert (24, 25). Die NADPH-Stöchiometrie beträgt in beiden Fällen 2. Es wurde deshalb angenommen, daß im Gegensatz zu den Dioxygenasen die erfundungsgemäß Mutante F87L188A74 Indol in nur einer Position hydroxyliert, um Oxindol (2-Hydroxyindol) oder Indoxyl (3-Hydroxyindol) zu bilden.

### 4. Kinetische Parameter der Indolhydroxylierung

Reine Proben des Wildtyp-Enzyms P450 BM-3 und der Mutanten Leu188Gln, Phe87Val, F87L188 und F87L188A74 wurden zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Indolhydroxylierung verwendet. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 1 zusammengefaßt.

## DE 100 14 085 A 1

Tabelle 1

Kinetische Parameter der P450 BM-3 Mutanten für Indolhydroxylierung

Mutanten	$K_{cat}$ (S <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	$K_{cat}/K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
WT	- <sup>a)</sup>	-	-
Leu188Gln	n.d. <sup>b)</sup>	n.d.	n.d.
Phe87Val	2,03 (0,14)	17,0 (1,0)	119
F87L188	2,28 (0,16)	4,2 (0,4)	543
F87L188A74	2,73 (0,16)	2,0 (0,2)	1365

<sup>a)</sup> keine Aktivität wurde beobachtet;<sup>b)</sup> nicht bestimmt (Aktivität war zu gering um gemessen zu werden)

Selbst beim Überschuß an gereinigtem Enzym und hoher Indolkonzentration ist das Wildtyp-Enzym nicht in der Lage, Indol zu oxidieren. Die Mutante Leu188Gln zeigt eine geringe Aktivität. Die Mutante Phe87Val zeigt eine katalytische Wirksamkeit von 119 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> für die Indolhydroxylierung. Die katalytische Effizienz der Doppelmutante F87L188 (Phe87Val, Leu188Gln) erhöhte sich auf 543 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> und wurde durch Einführung der weiteren Substitution Ala74Gly auf 1365 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> erhöht. Die K<sub>cat</sub>-Werte erhöhten sich von Phe87Val zur Dreifachmutante hin um insgesamt 35%, während die K<sub>m</sub>-Werte etwa um das Siebenfache abnahmen. Dies weist darauf hin, daß Ala74Gly und Leu188Gln vorwiegend an der Substatbindung beteiligt sind.

Die Indol-Turnover-Rate (K<sub>cat</sub> = 2,73 s<sup>-1</sup>) war für die Dreifachmutante F87L188A74 mehr als zehnfach höher als für die meisten P450-Enzyme (18).

## Beispiel 6

## n-Oktanhydroxylierung mit modifizierter Cytochrom P450 Monooxygenase

Die Umsetzungen wurden mit einer P450 BM-3-Monooxygenase Mutante durchgeführt, die folgende Mutationen enthält: Phe87Val Leu188Gln Ala74Gly

Als Substrat wurde n-Octan gewählt. Für die Hydroxylierung des n-Octans wurde folgender aerober Reaktionsansatz verwendet:

P450 BM-3 Mutante: 17,5 mg

Reaktionspuffer: 9,1 ml (Kaliumphosphat-Puffer 50 mM, pH 7,5)

Substrat: 50 µl einer 60 mM Lösung (in Aceton)

Temperatur: 25°C

Enzymlyophilisat wurde in 500 µl Reaktionspuffer gelöst und zunächst mit Substrat und Reaktionspuffer 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl NADPH-Lösung (5 mg/ml). Die NADPH Zugabe wurde noch zweimal wiederholt. Der Reaktionsverlauf wurde durch Absorptionsmessungen bei 340 nm verfolgt, wobei die NADPH Abnahme beobachtet werden kann. NADPH wird dabei in 300 µl-Schritten zugegeben, da eine zu hohe Konzentration an NADPH in der Reaktionslösung zu einer Inaktivierung des Enzyms führt. Zur Isolierung der Produkte wurde anschließend die Reaktionslösung 3 mal mit 5 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingeengt. Anschließend wurden die Produkte über DC, GC/MS und NMR charakterisiert.

Die GC/MS Analyse des Reaktionsgemisches führte zu folgendem Ergebnis:

55

60

65

Verbindung	Rt [min] <sup>1)</sup>	Umsatz [%]
4-Octanol	13.51	37
3-Octanol	14.08	47
2-Octanol	14.26	16

5

<sup>1)</sup> Temperaturprogramm: 40°C 1min isotherm / 3°C/min 95°C / 10°C/min  
 10 275°C; Apparatur: Finnigan MAT 95; GC: HP 5890 Series II Split  
 Injector; Säule: HP-5MS (Methylsiloxan) 30m x 0.25mm; Träger-  
 15 gas: 0,065 ml/min He

Edukt wurde nicht mehr gefunden.

## Beispiel 7

20

## Hydroxylierung von Aromaten, Heteroaromaten und Trimethylcyclohexenylverbindungen

a) Beispiel 6 wurde wiederholt, wobei jedoch anstelle von n-Oktan als Substrat Naphthalin eingesetzt wurde. Als Produkte wurden 1-Naphthol und cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin identifiziert. Vom eingesetzten Naphthalin wurden 88% umgesetzt.

Analytik für Umsetzungen mit Naphthalin

GC:

Apparatur: Carlo Erba Strumentazion Typ HRGC 4160 on Column Injector; Säule: DB5 30 m x 0,2 mm; Material:  
 25 5% Diphenyl- 95% Dimethylpolysiloxan; Trägergas: 0,5 bar H<sub>2</sub>; Temperaturprogramm: 40°C 1 min isotherm/  
 10°C/min bis 300°C

Rt(1-Naphthol) = 16.68

30

NMR:

Im <sup>1</sup>H-NMR konnte 1-Naphthol und cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin identifiziert werden.

b) Beispiel 6 wurde wiederholt, wobei jedoch anstelle von n-Oktan als Substrat 8-Methylchinolin eingesetzt wurde.  
 35 Als Hauptprodukt wurde 5-Hydroxy-8-methylchinolin neben weiteren Derivaten (Produktverhältnis 5 : 1) identifiziert. Vom eingesetzten Edukt wurden 35% umgesetzt.

c) Beispiel 6 wurde wiederholt, wobei jedoch anstelle von n-Oktan als Substrat  $\alpha$ -Ionon eingesetzt wurde. Als Hauptprodukt wurde 3-Hydroxy- $\alpha$ -ionon neben weiteren Derivaten (Produktverhältnis 76 : 24) identifiziert. Vom eingesetzten Edukt wurden 60% umgesetzt.

d) Beispiel 6 wurde wiederholt, wobei jedoch anstelle von n-Oktan als Substrat Cumol (i-Propylbenzol) eingesetzt  
 40 wurde. Es wurden fünf Monohydroxyprodukte und ein Dihydroxyprodukt identifiziert. Vom eingesetzten Edukt wurden 70% umgesetzt.

35

40

## LITERATUR

45

- Yano, T., Oue, S., and Kagamiyama, H. (1998) Proc. Natl. Acad Sci. USA 95, 5511–5515.
- Zhang, J.-H., Dawes, G., and Stemmer, W. P. C. (1997) Proc. Natl. Acad Sci. USA 94, 4504–4509.
- Wan, L., Twitchett, M. B., Eltis, L. D., Mauk, A. G., and Smith, M. (1998) Proc. Natl. Acad Sci USA 95, 12825–12831.
- Cronin, C. N. (1998) J. Biol. Chem 273, 24465–24469.
- Wilks, H. M., Hart, K-W., Feeney, R., Dunn, C. R., Muirhead, H., Chia, W. N., Barstow, D. A., Atkinson, T., Clarke, A. R., Holbrook, I. J. (1988) Science 242, 1541–1544.
- Hedstrom, L., Szilagyi, L., Rutter, W. J. (1992) Science 255, 1249–1253.
- Tucker, C. L., Hurley, J. H., Miller, T. R., and Hurley, I. B. (1998) Proc. Natl. Acad Sci. USA 95, 5993–5997.
- Quemeneur, E., Moutiez, J.-B. C., and Menez, A. (1998) Nature (London) 391, 301–303.
- Marsden, A.-F. A., Wilkinson, B., Cortes, J., Dunster, N. J., Staunton, I., Leadlay, P. F. (1998) Science 279, 199–201.
- Chen, R., Greer, A., and Dean, A. M. (1998) Proc. Natl. Acad Sci. US 95, 11666–11670.
- Boddupalli, S. S., Estabrook, R. W. and Peterson, J. A. (1990) J. Biol. Chem 265, 4233–4239.
- Capdevila, J. H., Wie, S., Helvig, C., Falck, J. R., Belosuditsev, Y., Truan, G., Graham-Lorence, S. E., and Peterson, J. A. (1996) J. Biol. Chem 271, 22663–22671.
- Graham-Lorence, S., Truan, G., Peterson, J. A., Flack, J. R., WeL S., Helvig, C., Capdevilla, J. H. (1997) J. Biol. Chem 272, 1127–1135.
- Li, H., Poulos, T. L. (1997) Nat. Structural Biol., 4, 140–146.
- Ravichandran, K G., Sekhar, S., Boddupalli, S., Hasemann, C. A., Peterson, J. A., Deisenhofer, J (1993) Science 261, 731–736.
- Modi S., Sutcliffe, M. J., Primrose, W. U., Lian, L.- Y., Roberts, G. C. K (1996) Nat. Structural. Biol. 3, 414–417.
- Oliver, C. F., ModL S., Primrose, W. U., Lian, L. Y. and Roberts, G. C. K (1997) Biochem. J 327, 537–544.
- Guengerich, F. G. (1991) J. Biol. Chem 266, 10019–10022.

55

60

65

DE 100 14 085 A 1

19. Cherry, J. R., Lamsa, M. H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A., and Pedersen, A. H. (1999) *Nature Biotechnology* 17, 379-384.
20. Schwaneberg, U., Schmidt-Dannert, C., Schmitt, J., and Schmid, R. D. (1999) *Anal Biochem.* 269, 359-366.
21. Schwaneberg, U., Sprauer, A.L., Schmidt-Dannert, C., and Schmid, R. D. *J of Chromatogr. A*, in press.
22. Oliver, C. F., Modi, S., Sutcliffe, M. J., Primrose, W. U., Lian, L. Y. and Roberts, G. C. K (1997) *Biochemistry* 36, 1567-1572.
23. Hart, S., Koch, K.R., and Woods, D. R. (1992) *J Gen. Microbiol.* 138, 211-216
24. Murdock, D., Ensley, B. D., Serdar, C. and Thalen, M. (1993) *Bio/Technology* 11, 381-385.
25. O'Connor, ICE., Dobson, A-W. and Hartmans, S. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4287-4291.
- 10 26. Eaton, R. W. and Chapman, P. J. (1995) *J Bacteriol.* 177, 6983-6988.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## DE 100 14 085 A 1

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BASF Aktiengesellschaft

<120> Neue Cytochrom P450 Monoxygenasen und deren Verwendung  
zur Oxidation von organischen Verbindungen 5

&lt;130&gt; M/41148

&lt;140&gt;

10

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 9

15

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3150

20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bacillus megaterium

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

25

&lt;222&gt; (4)..(3150)

&lt;400&gt; 1

atg aca att aaa gaa atg cct cag cca aaa acg ttt gga gag ctt aaa

48

Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys

30

1

5

10

15

aat tta ccg tta tta aac aca gat aaa ccg gtt caa gct ttg atg aaa

96

Asn Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Glu Ala Leu Met Lys

35

20

25

30

att gcg gat gaa tta gga gaa atc ttt aaa ttc gag ggc cct ggt cgt

144

Ile Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg

40

35

40

45

gta acg cgc tac tta tca agt cag cgt cta att aaa gaa gca tgc gat

192

Val Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp

45

50

55

60

gaa tca cgc ttt gat aaa aac tta agt caa gcg ctt aaa ttt gta cgt

240

Glu Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg

50

65

70

75

gat ttt gca gga gac ggg tta ttt aca agc tgg acg cat gaa aaa aat

288

Asp Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn

55

80

85

90

95

tgg aaa aaa gcg cat aat atc tta ctt cca agc ttc agt cag cag gca

336

Trp Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala

55

100

105

110

atg aaa ggc tat cat gcg atg atg gtc gat atc gcc gtg cag ctt gtt

384

Met Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val

60

115

120

125

caa aag tgg gag cgt cta aat gca gat gag cat att gaa gta ccg gaa

432

Gln Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu

65

130

135

140

gac atg aca cgt tta acg ctt gat aca att ggt ctt tgc ggc ttt aac

480

## DE 100 14 085 A 1

	Asp Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn			
145	150	155		
5	tat cgc ttt aac agc ttt tac cga gat cag cct cat cca ttt att aca		528	
	Tyr Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr			
160	165	170	175	
10	agt atg gtc cgt gca ctg gat gaa gca atg aac aag ctg cag cga gca		576	
	Ser Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala			
	180	185	190	
15	aat cca gac gac cca gct tat gat gaa aac aag cgc cag ttt caa gaa		624	
	Asn Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu			
	195	200	205	
20	gat atc aag gtg atg aac gac cta gta gat aaa att att gca gat cgc		672	
	Asp Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg			
	210	215	220	
25	aaa gca agc ggt gaa caa agc gat gat tta tta acg cat atg cta aac		720	
	Lys Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn			
	225	230	235	
30	gga aaa gat cca gaa acg ggt gag ccg ctt gat gac gag aac att cgc		768	
	Gly Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg			
	240	245	250	255
35	tat caa att att aca ttc tta att gcg gga cac gaa aca aca agt ggt		816	
	Tyr Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly			
	260	265	270	
40	ctt tta tca ttt gcg ctg tat ttc tta gtg aaa aat cca cat gta tta		864	
	Leu Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu			
	275	280	285	
45	caa aaa gca gca gaa gca gca cga gtt cta gta gat cct gtt cca		912	
	Gln Lys Ala Ala Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro			
	290	295	300	
50	agc tac aaa caa gtc aaa cag ctt aaa tat gtc ggc atg gtc tta aac		960	
	Ser Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn			
	305	310	315	
55	gaa gcg ctg cgc tta tgg cca act gct cct gcg ttt tcc cta tat gca		1008	
	Glu Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala			
	320	325	330	335
60	aaa gaa gat acg gtg ctt gga gga gaa tat cct tta gaa aaa ggc gac		1056	
	Lys Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp			
	340	345	350	
65	gaa cta atg gtt ctg att cct cag ctt cac cgt gat aaa aca att tgg		1104	
	Glu Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp			
	355	360	365	
70	gga gac gat gtg gaa gag ttc cgt cca gag cgt ttt gaa aat cca agt		1152	
	Gly Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser			
	370	375	380	
75	gcg att ccg cag cat gcg ttt aaa ccg ttt gga aac ggt cag cgt gcg		1200	
	Ala Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala			
	385	390	395	

## DE 100 14 085 A 1

tgt atc ggt cag cag ttc gct ctt cat gaa gca acg ctg gta ctt ggt Cys Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly 400 405 410 415	1248	
atg atg cta aaa cac ttt gac ttt gaa gat cat aca aac tac gag ctg Met Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu 420 425 430	1296	5
gat att aaa gaa act tta acg tta aaa cct gaa ggc ttt gtg gta aaa Asp Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys 435 440 445	1344	10
gca aaa tcg aaa aaa att ccg ctt ggc ggt att cct tca cct agc act Ala Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr 450 455 460	1392	15
gaa cag tct gct aaa aaa gta cgc aaa aag gca gaa aac gct cat aat Glu Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn 465 470 475	1440	20
acg ccg ctg ctt gtg cta tac ggt tca aat atg gga aca gct gaa gga Thr Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly 480 485 490 495	1488	25
acg gcg cgt gat tta gca gat att gca atg agc aaa gga ttt gca ccg Thr Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phè Ala Pro 500 505 510	1536	30
cag gtc gca acg ctt gat tca cac gcc gga aat ctt ccg cgc gaa gga Gln Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly 515 520 525	1584	35
gct gta tta att gta acg gcg tct tat aac ggt cat ccg cct gat aac Ala Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn 530 535 540	1632	
gca aag caa ttt gtc gac tgg tta gac caa gcg tct gct gat gaa gta Ala Lys Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val 545 550 555	1680	40
aaa ggc gtt cgc tac tcc gta ttt gga tgc ggc gat aaa aac tgg gct Lys Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala 560 565 570 575	1728	45
act acg tat caa aaa gtg cct gct ttt atc gat gaa acg ctt gcc gct Thr Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala 580 585 590	1776	50
aaa ggg gca gaa aac atc gct gac cgc ggt gaa gca gat gca agc gac Lys Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp 595 600 605	1824	55
gac ttt gaa ggc aca tat gaa gaa tgg cgt gaa cat atg tgg agt gac Asp Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp 610 615 620	1872	
gta gca gcc tac ttt aac ctc gac att gaa aac agt gaa gat aat aaa Val Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys 625 630 635	1920	
tct act ctt tca ctt caa ttt gtc gac agc gcc ggc gat atg ccg ctt Ser Thr Leu Ser Leu Gln Phe Val Asp Ser Ala Ala Asp Met Pro Leu 640 645 650 655	1968	65

## DE 100 14 085 A 1

gct aaa atg cac ggt gct ttt tca acg aac gtc gta gca agc aaa gaa Ala Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu 660	665	670	2016	
5 ctt caa cag cca ggc agt gca cga agc acg cga cat ctt gaa att gaa Leu Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu 675	680	685	2064	
10 ctt cca aaa gaa gct tct tat caa gaa gga gat cat tta ggt gtt att Leu Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile 690	695	700	2112	
15 cct cgc aac tat gaa gga ata gta aac cgt gta aca gca agg ttc ggc Pro Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly 705	710	715	2160	
20 cta gat gca tca cag caa atc cgt ctg gaa gca gaa gaa gaa aaa tta Leu Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Lys Leu 720	725	730	735	2208
25 gct cat ttg cca ctc gct aaa aca gta tcc gta gaa gag ctt ctg caa Ala His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln 740	745	750	2256	
30 tac gtg gag ctt caa gat cct gtt acg cgc acg cag ctt cgc gca atg Tyr Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met 755	760	765	2304	
35 gct gct aaa acg gtc tgc ccg ccg cat aaa gta gag ctt gaa gcc ttg Ala Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Ala Leu 770	775	780	2352	
40 ctt gaa aag caa gcc tac aaa gaa caa gtg ctg gca aaa cgt tta aca Leu Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr 785	790	795	2400	
45 atg ctt gaa ctg ctt gaa aaa tac ccg gcg tgg gaa atg aaa ttc acg Met Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser 800	805	810	815	2448
50 gaa ttt atc gcc ctt ctg cca agc ata cgc ccg cgc tat tac tcg att Glu Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile 820	825	830	2496	
55 tct tca tca cct cgt gtc gat gaa aaa caa gca agc atc acg gtc agc Ser Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser 835	840	845	2544	
60 gtt gtc tca gga gaa gcg tgg agc gga tat gga gaa tat aaa gga att Val Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile 850	855	860	2592	
65 gcg tcg aac tat ctt gcc gag ctg caa gaa gga gat acg att acg tgc Ala Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys 865	870	875	2640	
70 ttt att tcc aca ccg cag tca gaa ttt acg ctg cca aaa gac cct gaa Phe Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu 880	885	890	895	2688
75 acg ccg ctt atc atg gtc gga ccg gga aca ggc gtc gcg ccg ttt aga Thr Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg 880				2736

## DE 100 14 085 A 1

900	905	910	
ggc ttt gtg cag gcg cgc aaa cag cta aaa gaa caa gga cag tca ctt Gly Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu 915	920	925	2784
gga gaa gca cat tta tac ttc ggc tgc cgt tca cct cat gaa gac tat Gly Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr 930	935	940	2832
ctg tat caa gaa gag ctt gaa aac gcc caa agc gaa ggc atc att acg Leu Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr 945	950	955	2880
ctt cat acc gct ttt tct cgc atg cca aat cag ccg aaa aca tac gtt Leu His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val 960	965	970	2928
cag cac gta atg gaa caa gac ggc aag aaa ttg att gaa ctt ctt gat Gln His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp 980	985	990	2976
caa gga gcg cac ttc tat att tgc gga gac gga agc caa atg gca cct Gln Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro 995	1000	1005	3024
gcc gtt gaa gca acg ctt atg aaa agc tat gct gac gtt cac caa gtc Ala Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val 1010	1015	1020	3072
agt gaa gca gac gct cgc tta tgg ctg cag cag cta gaa gaa aaa ggc Ser Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly 1025	1030	1035	3120
cga tac gca aaa gac gtc tgg gct ggg taa Arg Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly 1040	1045		3150
<210> 2			40
<211> 1048			45
<212> PRT			
<213> Bacillus megaterium			
<400> 2			
Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys Asn 1 5 10 15			50
Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys Ile 20 25 30			55
Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg Val 35 40 45			
Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp Glu 50 55 60			60
Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg Asp 65 70 75 80			65
Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn Trp 85 90 95			

## DE 100 14 085 A 1

Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala Met  
 100 105 110

5 Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val Gln  
 115 120 125

Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu Asp  
 130 135 140

10 Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn Tyr  
 145 150 155 160

15 Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr Ser  
 165 170 175

Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala Asn  
 180 185 190

20 Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu Asp  
 195 200 205

Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg Lys  
 210 215 220

Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn Gly  
 225 230 235 240

30 Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg Tyr  
 245 250 255

Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly Leu  
 260 265 270

35 Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu Gln  
 275 280 285

40 Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro Ser  
 290 295 300

Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn Glu  
 305 310 315 320

45 Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala Lys  
 325 330 335

50 Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp Glu  
 340 345 350

Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp Gly  
 355 360 365

55 Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser Ala  
 370 375 380

Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala Cys  
 60 385 390 395 400

Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly Met  
 405 410 415

65 Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu Asp  
 420 425 430

## DE 100 14 085 A 1

Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys Ala			
435	440	445	
Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr Glu			5
450	455	460	
Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn Thr			
465	470	475	480
Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly Thr			
485	490	495	
Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phe Ala Pro Gln			15
500	505	510	
Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly Ala			
515	520	525	
Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn Ala			20
530	535	540	
Lys Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val Lys			
545	550	555	560
Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala Thr			
565	570	575	
Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala Lys			30
580	585	590	
Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp Asp			
595	600	605	35
Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp Val			
610	615	620	
Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys Ser			40
625	630	635	640
Thr Leu Ser Leu Gln Phe Val Asp Ser Ala Ala Asp Met Pro Leu Ala			
645	650	655	45
Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu Leu			
660	665	670	
Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu Leu			50
675	680	685	
Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile Pro			
690	695	700	
Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly Leu			
705	710	715	720
Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Lys Leu Ala			
725	730	735	60
His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln Tyr			
740	745	750	
Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met Ala			65
755	760	765	

## DE 100 14 085 A 1

Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu Leu  
 770 775 780  
 5 Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr Met  
 785 790 795 800  
 Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser Glu  
 805 810 815  
 10 Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser  
 820 825 830  
 15 Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser Val  
 835 840 845  
 Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile Ala  
 850 855 860  
 20 Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys Phe  
 865 870 875 880  
 Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu Thr  
 25 885 890 895  
 Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg Gly  
 900 905 910  
 30 Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu Gly  
 915 920 925  
 Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Gln Asp Tyr Leu  
 35 930 935 940  
 Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr Leu  
 945 950 955 960  
 40 His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val Gln  
 965 970 975  
 His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp Gln  
 980 985 990  
 45 Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro Ala  
 995 1000 1005  
 50 Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val Ser  
 1010 1015 1020  
 Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly Arg  
 1025 1030 1035 1040  
 55 Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly  
 1045  
 60 <210> 3  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 65 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

DE 100 14 085 A 1

<400> 3  
gcaggagacg gggtgnnnac aagctggacg 30  
  
<210> 4 5  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz 10  
  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer  
  
<400> 4 15  
cgtccagctt gtnnncaacc cgtctcctgc 30  
  
<210> 5 20  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220> 25  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer  
  
<400> 5 30  
gaagcaatga acaagnnnca gcgagcaaat ccag 34  
  
<210> 6 35  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer  
  
<400> 6 40  
ctggatttgc tcgctgnnnc ttgttcattg 30  
  
<210> 7 45  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220> 50  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer  
  
<400> 7 55  
gcttgataaa aaacttaaag tcaannnctt aaatttgtac g 41  
  
<210> 8 60  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer  
  
<400> 8 65  
cgtagaaatt taagnnnntg acttaagttt ttatcaaagc 40



## DE 100 14 085 A 1

290	295	300	
Ser Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn			
305	310	315	320
Glu Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala			
325	330	335	
Lys Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp			10
340	345	350	
Glu Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp			
355	360	365	15
Gly Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser			
370	375	380	
Ala Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala			20
385	390	395	400
Cys Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly			
405	410	415	25
Met Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu			
420	425	430	
Asp Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys			30
435	440	445	
Ala Lys Ser Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr			
450	455	460	35
Glu Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn			
465	470	475	480
Thr Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly			
485	490	495	40
Thr Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phe Ala Pro			
500	505	510	
Gln Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly			45
515	520	525	
Ala Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn			
530	535	540	50
Ala Lys Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val			
545	550	555	560
Lys Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala			
565	570	575	55
Thr Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala			
580	585	590	60
Lys Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp			
595	600	605	
Asp Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp			65
610	615	620	
Val Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys			

## DE 100 14 085 A 1

	625	630	635	640
5	Ser Thr Leu Ser Leu Gln Phe Val Asp Ser Ala Ala Asp Met Pro Leu 645		650	655
	Ala Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu 660	665	670	
10	Leu Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu 675	680	685	
	Leu Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile 690	695	700	
15	Pro Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly 705	710	715	720
20	Leu Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Lys Leu 725	730	735	
	Ala His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln 740	745	750	
25	Tyr Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met 755	760	765	
30	Ala Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu 770	775	780	
	Leu Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr 785	790	795	800
35	Met Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser 805	810	815	
40	Glu Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile 820	825	830	
	Ser Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser 835	840	845	
45	Val Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile 850	855	860	
50	Ala Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys 865	870	875	880
	Phe Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu 885	890	895	
55	Thr Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg 900	905	910	
	Gly Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu 915	920	925	
60	Gly Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr 930	935	940	
65	Leu Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr 945	950	955	960
	Leu His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val			

**DE 100 14 085 A 1**

965

970

975

Gln His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp  
 980 985 990

5

Gln Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro  
 995 1000 1005

10

Ala Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val  
 1010 1015 1020

10

Ser Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly  
 1025 1030 1035 1040

15

Arg Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly  
 1045

20

**Patentansprüche.**

1. Cytochrom P450 Monooxygenase, welche zu wenigstens einer der folgenden Reaktionen befähigt ist:
  - a) Oxidation gegebenenfalls substituierter N-, O- oder S-heterocyclischer ein-, zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen;
  - b) Oxidation gegebenenfalls substituierter ein- oder mehrkerniger Aromaten;
  - c) Oxidation geradkettiger oder verzweigter Alkane und Alkene;
  - d) Oxidation gegebenenfalls substituierter Cycloalkane und Cycloalkene
2. Monooxygenase nach Anspruch 1, deren Substrat-bindender Bereich durch ortsspezifische Mutagenese zur funktionalen Aufnahme des zu oxidierenden Substrats befähigt ist.
3. Monooxygenase nach Anspruch 1 oder 2, abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenasen bakteriellen Ursprungs.
4. Monooxygenase nach Anspruch 3, abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus Bacillus megaterium mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, welche wenigstens eine funktionelle Mutation in einem der Aminosäuresequenzbereiche 172–224, 39–43, 48–52, 67–70, 330–335, 352–356, 73–82 und 86–88 aufweist.
5. Monooxygenase nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens eine der folgenden ein- oder mehrfachen Aminosäuresubstitutionen aufweist:
  - e) Phe87Val;
  - f) Phe87Val, Leu188Gln; oder
  - g) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly;
 sowie funktionale Äquivalente davon.
6. Nukleinsäuresequenz, kodierend für eine Monooxygenase nach einem der vorherigen Ansprüche.
7. Expressionskonstrukt, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine kodierende Sequenz, welche eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 6 umfasst.
8. Vektor, umfassend wenigstens ein Expressionskonstrukt nach Anspruch 7.
9. Rekombinanter Mikroorganismus, transformiert mit wenigstens einem Vektor nach Anspruch 8.
10. Mikroorganismus nach Anspruch 9, ausgewählt unter Bakterien der Gattung Escherichia.
11. Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation einer Verbindung gemäß der Definition von Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man
  - a1) einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 9 oder 10 in einem Kulturmedium, in Gegenwart eines exogenen oder intermediär gebildeten Substrats, kultiviert; oder
  - a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium mit einem Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 inkubiert; und
  - b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das exogene oder intermediär gebildete Substrat ausgewählt ist unter
  - a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;
  - b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;
  - c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;
  - d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat intermediär gebildetes Indol ist und man aus dem Medium das anfallende Indigo und/oder Indirubin isoliert, welches durch Oxidation von intermediär gebildetem Indol erzeugt wurde.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man die Indoloxidation durch Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20 bis 40°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt.
15. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man als exogenes Substrat wenigstens eine Verbindung, ausgewählt unter den oben definierten Gruppen a) bis d), einem Medium zusetzt und die Oxidation durch en-

# DE 100 14 085 A 1

zymatische Umsetzung des substrathaltiges Mediums in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Temperatur von etwa 20 bis 40°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt, wobei das substrathaltige Medium außerdem bezogen auf das Substrat einen etwa 10- bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält.

- 5 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man als exogenes Substrat eine Verbindung, ausgewählt unter Indol, n-Hexan, n-Octan, n-Decan, n-Dodecan, Cumol, 1-Methylindol, 5-Cl- oder Br-Indol, Inden, Benzo thiophen,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ionon, Acridin, Naphthalin, 6-Methyl- oder 8-Methylchinolin, Chinolin und Chinaldin, einsetzt.
- 10 17. Bioreaktor, umfassend ein Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder einen rekombinanten Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 9 oder 10 in immobilisierter Form.
18. Verwendung einer Cytochrom P450 Monoxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 5, eines Vektors nach Anspruch 8, oder eines Mikroorganismus nach Anspruch 9 oder 10 zur mikrobiologischen Oxidation von
- 15 a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen armotischen Verbindungen;  
b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;  
c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen; und/oder  
d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen.
19. Verwendung nach Anspruch 18 zur Herstellung von Indigo und/oder Indirubin.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65